

IDTB, siendo eficaz para detectar las reacciones cruzadas con otras micobacterias del grupo *M. avium*, especialmente *M. a. paratuberculosis*. No obstante, se encontraron algunas contradicciones entre los resultados del test y la IDTB, como es el caso de los nueve rebaños claramente positivos al test y posteriormente negativos a la IDTB. En futuros ensayos sería conveniente hacer un seguimiento de

estos rebaños, repitiendo éstas y otras pruebas complementarias, como la realización de análisis anatómo-patológicos de los animales sacrificados en el matadero, y así valorar con más información los resultados obtenidos. Es de destacar que tanto en la primera como en la segunda IDTB no se utilizó el cutímetro para realizar la lectura, lo que pudo haber influido en una falta de sensibilidad de la IDTB.

## 1FD97-0770-CO2-02. Identificación y producción de antígenos recombinantes de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, para su uso en el inmunodiagnóstico de la Pleuroneumonía contagiosa bovina (PNCB)

Investigador responsable	Organismo
José Miguel Prieto Martín	SERIDA
Equipo investigador	
Alberto Espí Felgueroso	SERIDA
Victor Alvarez González	C. Medio Rural y Pesca
Francisco Parra Fernández	Univ. de Oviedo
José Manuel Martín Alonso	"
Jorge Cavielles Díaz	C. Medio Rural y Pesca

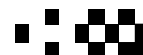
### Resultados

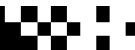
#### Cultivo y producción de antígenos de *Mycoplasma* spp.

Los antígenos fueron obtenidos a partir de las células lavadas y centrifugadas de *M. mycoides* subespecie *mycoides* (cepas de campo aisladas en Asturias) y de *M. bovis* y *M. capricolum* cedidas por el Laboratorio de Referencia para mycoplasmas de Lisboa. Se obtuvieron cuatro tipos de antígenos: El A-1, realizado mediante cinco periodos de sonicación de un minuto cada uno. El A-2, obtenido mediante tratamiento con calor a 121°C durante 20 minutos. El A-3, obtenido por precipitación en frío con tres volúmenes de etanol durante 24 horas. El A-4, que se trató de un antígeno recombinante obtenido mediante técnicas moleculares (realizado en la Universidad de Oviedo). El A-5, que fue obtenido mediante sonicación de células de *M. capricolum*.

### Objetivos

- Puesta a punto de un ensayo ELISA basado en un antígeno recombinante o en su defec-to en otros obtenidos por métodos convencionales, con el fin de sustituir a la técnica de la fijación del complemento (FC).
- Optimización de un western blot (WB) para determinar los polipéptidos más idóneos para diferenciar las reacciones cruzadas con otros mycoplasmas, especialmente *Mycoplasma bovis*.





## Identificación de antígenos mediante electroforesis y WB

Los antígenos A-1, A-2 y A-3 fueron sometidos a un análisis de proteínas mediante las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida, comprobándose, posteriormente, su capacidad antigénica mediante el WB. Para evaluar dicha capacidad antigénica, se emplearon varios sueros controles procedentes de vacas con títulos de 1:640 a FC y confirmada su positividad tanto por las lesiones como por el aislamiento de la bacteria. También se empleó un suero hiperinmune frente a *M. mycoides* subespecie *mycoides* obtenido en conejos a partir de células mezcladas al 50% con coadyuvante de Freund's incompleto.

Mediante la electroforesis se observó en todos los antígenos de 30 a 50 bandas de proteínas (p) que se corresponden con pesos de 14,4 a 212 Kda. El WB realizado con los sueros de bovino reveló bandas antigénicas entre los 38-110 Kda, de las cuales, las proteínas con 102, 96, 93, 64 y 52 Kda fueron las más antigénicas y se corresponden con las descritas por otros autores (Goncalves et al., 1998) como determinantes en el diagnóstico de la perineumonía contagiosa bovina mediante esta técnica. En todos los antígenos se observaron las mismas bandas aunque mostraron diferencias de intensidad. El antígeno A-2 fue con el que se obtuvo la mayor cantidad de proteína antigénica.

Cuando el WB fue realizado con una batería de 32 sueros bovinos reaccionantes a FC, se comprobó que el 20, 30, 17, 95 y 35% de los sueros reaccionaron frente a las proteínas p-102, p-96, p-93, p-64 y p-52, respectivamente. En ningún caso se encontraron sueros que reaccionaran a todas las bandas, lo cual se interpreta como sueros procedentes de animales libres de PNCB que interfieren con otros mycoplasmas, posiblemente por compartir antígenos comunes. En el estado actual de prevalencia de la PNCB en Asturias (sin focos en los últimos cinco años), es muy útil contar con una técnica como el WB, que permita com-

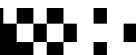
probar las posibles reacciones cruzadas con otros mycoplasmas.

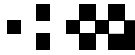
## Puesta a punto de ensayos ELISA

Mediante un ELISA indirecto convencional, todos los antígenos obtenidos fueron enfrentados a diferentes sueros de bovino, desde los muy positivos hasta los sueros totalmente negativos. El antígeno A-3, a la dilución 1:40, fue con el que se obtuvieron las mayores diferencias de densidad óptica (DO). Asimismo, la coloración de fondo fue la más baja de todos los antígenos probados. El mayor problema que presentó este antígeno fue su escaso rendimiento. Las diferencias de DO para los antígenos A-1 y A-2 entre los sueros positivos y negativos fueron significativamente menores. El antígeno A-4 solo funcionó aceptablemente en WB. Frente al antígeno A-5 reaccionaron tanto los sueros negativos como los positivos, sin que existiese una clara diferencia entre ambos, lo que viene a confirmar que comparten antígenos comunes con *M. mycoides* y que éstos pueden interferir con las pruebas serológicas.

## Evaluación del ELISA realizado con el antígeno A-3 y comparación con la FC

Para comprobar la robustez del ELISA puesto a punto con el antígeno A-3, se realizó una prueba sobre 714 sueros de vacuno pertenecientes a 28 rebaños, que fueron obtenidos durante el desarrollo de la campaña de saneamiento ganadero contra la PNCB, de los cuales, 61 fueron positivos a la FC (títulos entre 1:40 a 1:640). Las muestras fueron divididas en cuatro categorías en función de su posible relación con *M. mycoides*: grupo 1, animales negativos a FC cuyos rebaños fueron totalmente libres de PNCB; grupo 2, animales negativos a FC pertenecientes a rebaños con animales PNCB positivos; grupo 3, animales positivos a FC cuyos rebaños se encontraban totalmente libres de PNCB y el grupo 4 animales positivos





a FC pertenecientes a rebaños con animales PNCB positivos.

El punto de corte se obtuvo sobre la base del estudio previo con una batería de cinco sueros negativos (grupo 1) y cinco positivos (grupo 4). El valor de la media de DO de los sueros negativos más tres veces la desviación estándar representó el límite superior de negatividad, es decir, el punto de corte por encima del cual se consideraron a los sueros positivos.

La diferencia de DO obtenida entre los sueros positivos y negativos fue de 0,473, valor que está en el límite de separación entre dos poblaciones para que una prueba ELISA se la considere válida. Es de destacar que en el grupo 4 solamente el 47,22% de los sueros resultaron positivos. Así mismo, en el grupo de animales negativos (grupo 1), en el que tendrían que haber resultado en su mayoría negativos, se obtuvo un 51,95% de sueros positivos. No existieron tampoco diferencias significativas entre los sueros de los grupos 2 y 3.

Para calcular la concordancia entre el ELISA y la FC se compararon los 714 sueros investigados. El valor Kappa resultante fue de 0,003, con un nivel de confianza del 95%; la sensibili-

dad y especificidad del ELISA con respecto a la FC, fue del 57,37 % y del 41,50%, respectivamente.

La técnica ELISA descrita no puede aplicarse de forma rutinaria en una campaña de saneamiento contra la PNCB, ya que, la sensibilidad detectada, 57,37%, la invalida como prueba de criba, al no poder detectar gran parte de los animales positivos.

Los antígenos utilizados en estos análisis, como se deduce de los resultados obtenidos, son comunes a otros mycoplasmas y éstos inmunoreaccionan en pruebas de alta sensibilidad como el ELISA. Los mycoplasmas son bacterias que se encuentran en la mayoría de los animales, así el *M. bovis* produce neumonías y mamitis en las vacas, otros, como el *M. bovis* - *nitium* o *Mycoplasmas sp* bovine grupo 7, son causantes de poliartritis, abortos e infertilidad. Muchas especies de mycoplasmas ni siquiera llegan a producir síntomas. En consecuencia, prácticamente todos los bovinos son portadores de mycoplasmas y poseen anticuerpos en mayor o menor escala, dependiendo del estado de infección, que pueden ser detectados con las pruebas diagnósticas habituales e interferir en la interpretación de los resultados.